DNA/RNA 調製法 実験ガイド

PCR の鋳型となる DNA を調製するにはいくつかの方法があり、検体の種類や実験目的に応じて適切な方法を選択します。この文書では、これらの方法について実際の操作方法を具体的に解説します。また、RNA 調製の際の注意事項や RNA 調製用のキット等をご紹介します。

ー目次ー

1　実験に必要なもの

一般的な実験器具類

マイクロピペット（20, 200, 1000μl）およびチップ
1.5 ml チューブおよびチューブラック
攪拌機（Vortex）
小型遠心機（1.5 ml チューブ用）
ヒートブロック（熱処理や酵素処理に使用、ウォーターバスでも代用可）
サーマルサイクラ―（熱処理や酵素処理に使用）など
＊詳細は、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

その他

器具名称		用途など	
①	微量高速遠心機	1.5 mlチューブを冷却しながら遠心する装置。	

2　コロニーからの DNA 調製

熱抽出法

【注意】　熱抽出法は、主にグラム陰性菌から簡便に DNA を抽出するための方法です。真菌やグラム陽性菌では、十分な量の DNA が得られないことが多いため、お勧めしません。また、グラム陰性菌でも他の手法に比べると DNA 収量が少なくなることがあります。

① プレート上のコロニーから滅菌済のマイクロピペット用チップや白金耳で微量の菌体を取り、適当量（100～500μl）の滅菌水あるいは TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0）に懸濁する。
② 95℃以上で 10 分間熱処理をする。
③ 12,000 ～15,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

アルカリ熱抽出法

① プレート上のコロニーから滅菌済のマイクロピペット用チップや白金耳で微量の菌体を取り、50μl の滅菌水に懸濁する。

② 100 mM NaOH を 50μl 添加し、混合する。
③ 95℃以上で 10 分間熱処理する。
④ 1M Tris-HCl (pH7.0)を 11μl 添加し、混合する。
⑤ 12,000～15,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

SimplePrep reagent for DNA（製品コード 9180）による精製

① プレート上のコロニーから滅菌済のマイクロピペット用チップや白金耳で微量の菌体を取り、100μl の滅菌水に懸濁する。
② 0.2 ml の PCR チューブに、SimplePrep reagent for DNA の Reagent A 20μl と Reagent B 4μl を混合し、①の懸濁液 20μl を加えて混合する。
③ サーマルサイクラ―を用いて、37℃で 6 分、さらに 95℃で 3 分の処理を行う。
④ 滅菌蒸留水 80μl を加え、ピペッティングで混和したものを DNA サンプルとする。

3　増菌培養液からの DNA 調製

熱抽出法

① 培養液 1.3 ml を 1,000 rpm で 1 分間遠心し、上清 1.0～1.2 ml を新しいチューブに回収する。
② 12,000～15,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を除去する。
③ 沈殿を適当量（100～500μl）の滅菌水あるいは TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0）に懸濁する。
④ 95℃以上で 10 分間熱処理をする。
⑤ 12,000～15,000 rpm 以上で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

増菌培養液には検体由来の夾雑物が存在し、PCR 阻害を引き起こすことがあります。その場合には、熱抽出物を滅菌水で希釈して PCR に使用してください。あるいは、以下の方法を用いると DNA の純度や収量が向上し、PCR 反応性が改善することがあります。

熱抽出法のオプション 1：沈殿の洗浄

A） 沈殿の再懸濁液（前述の③）を再度、12,000～15,000 rpm で 3 分間遠心する。
B） 上清を除去し、沈殿を適当量（100～500μl）の滅菌水あるいは TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0）に懸濁する。
C） 以降、前述の④～⑤と同様な操作を行う。

熱抽出法のオプション２：Chelex の利用

A) 前述の①～②の操作で得られた沈殿に、200μl の 10% Chelex を添加し、混合する。*

B) 95℃以上で 10 分間熱処理をする。

C) 攪拌機（Vortex）で混合する。

D) 12,000～15,000 rpm 以上で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

* Chelex 100 Resin（Bio-Rad, #142-1253）を滅菌水に懸濁して 10% Chelex を調製する。ピペットマンで分取する際には、樹脂が詰まるのを防ぐため、先の太いチップか、先端を切ったチップを使用する。

熱抽出法のオプション３：アクロモペプチダーゼの利用（グラム陽性菌に）

A) 前述の①～②の操作で得られた沈殿を 100μl のアクロモペプチダーゼ液（250 U/ml, in TE buffer）に懸濁する。*

B) 37～55℃で 10～15 分間インキュベートする。

C) 100μl の 10% Chelex を添加し、混合する。

D) 95℃以上で 10 分間熱処理をする。

E) 攪拌機（Vortex）で混合する。

F) 12,000～15,000 rpm 以上で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

* アクロモペプチダーゼ, 粗製品, 溶菌酵素（和光純薬工業(株)、#014-09661）。グラム陽性菌の細胞壁が分解されて、DNA の回収量が増加する。腸内細菌科やビブリオ科の細菌群の場合には必要ないが、処理による検出感度の低下は生じない。

アルカリ熱抽出法

＊ 厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌 O26、O111 及び O157 の検査法について」（食安監発 0515 第 3 号）より引用

① 培養液 0.1 ml をマイクロチューブにとり、10,000×g、10 分間遠心する。

② 上清を取り除いた沈渣に 50 mM NaOH 85μl を添加する。

③ 100℃で 10 分間加熱処理する。

④ 1M Tris-HCl (pH7.0) 15μl を加えて中和する。

⑤ 2,000～10,000×g、10 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

4　DNA 精製キットについて

高純度な DNA を調製する必要がある場合には、DNA 精製キットを使用します。タカラバイオでは、マッハライ・ナーゲル社の各種核酸精製キットを取り扱っており、検体の種類や量に応じた幅広いラインナップとなっています。以下に主な製品をご紹介します。

製品名称		用途など	
①	NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.50等）	動物組織、細胞、バクテリア、酵母などから効率よくゲノムDNAを精製	
②	NucleoSpin® Tissue XS（製品コード 740901.50等）	少量の動物組織、細胞、バクテリア、酵母などからのゲノムDNAを精製	
③	NucleoSpin® Soil（製品コード 740780.50 等）	さまざまな土壌からのDNA抽出 PCR阻害物質の除去に効果的	

5　RNA 調製について

RNA 調製の際の注意事項

RNA は DNA に比べて分解されやすいので、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は清潔なマスクおよびディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具などの RNase 除去には RNase-OFF（製品コード 9037）の使用をお勧めします。また、RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用としてください。

RNA 精製キットについて

高純度な RNA を調製する必要がある場合には、RNA 精製キットを使用します。タカラバイオでは、マッハライ・ナーゲル社の各種核酸精製キットを取り扱っており、検体の種類や量に応じた幅広いラインナップとなっています。以下に主な製品をご紹介します。

なお、検出系や検出目的によっては、簡易的な方法で RNA を調製する場合もあります。詳しくは、関連製品の取扱説明書をご参照ください。

製品名称		用途など	
①	NucleoSpin® RNA II（製品コード 740955.50等）	動物組織、細胞、バクテリア、酵母などからのtotal RNA調製	
②	NucleoSpin® RNA XS（製品コード 740902.50等）	微量・少量サンプルからのtotal RNA調製	
③	NucleoSpin RNA® Plant（製品コード 740949.50 等）	植物細胞や組織からの高純度total RNA精製	